

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001 年 8 月 23 日 (23.08.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/60370 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 31/505, (YAMAMOTO, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社内 Tokyo (JP).
A61P 35/00 // C07D 239/46
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07573
- (22) 国際出願日: 2000 年 10 月 27 日 (27.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-37313 2000 年 2 月 16 日 (16.02.2000) JP
特願2000-37314 2000 年 2 月 16 日 (16.02.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 湯山弘法 (YUYAMA, Hironori) [JP/JP]. 藤森 明 (FUJIMORI, Akira) [JP/JP]. 佐藤征直 (SANAGI, Masanao) [JP/JP]. 原田博規 (HARADA, Hironori) [JP/JP]. 小坪明子 (KOAKUTSU, Akiko) [JP/JP]. 森美樹子 (MORI, Mikiko) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 山本信行
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR ENDOTHELIN-INDUCED DISEASES

(54) 発明の名称: エンドセリン誘発疾患の治療剤

(57) Abstract: Drug compositions for treatment of prostatic cancer, containing as the active ingredient N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenyl-ethanesulfonamide or pharmaceutically acceptable salts thereof.

(57) 要約:

N-〔6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル〕-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する前立腺癌の治療用医薬組成物。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

明 細 書

医薬組成物

技術分野

本発明は、医薬、とりわけ前立腺癌等のエンドセリン誘発性疾患の疼痛緩和剤；造骨性病変の改善剤及び／又は造骨に伴う疼痛緩和剤；前立腺癌の骨転移による造骨性病変の改善剤及び／又は前立腺癌の骨転移に伴う疼痛緩和剤；前立腺癌の癌細胞増殖抑制剤；或いは、前立腺癌の進展抑制剤；に係るものである。

背景技術

N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミド又はその塩は国際公開第97/22595号公報に記載されており、エンドセリンET_A受容体に対するET-1の結合抑制作用、及び、ET-1誘発性の血管収縮・昇圧に対する抑制作用が開示され、心血管系疾患を初めとする、エンドセリンが関与する種々の疾患の処置に用いることができることが示唆されている。

本発明者は新規な治療薬の創製を目的として、N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミド又はその塩の更に具体的な疾患に対する治療可能性について鋭意検討を行った。

発明の開示

その結果、本発明者はN-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミド又はその塩が、癌（特に前立腺癌、乳癌、卵巣癌）、関節炎、前立腺炎、神経膠腫、末梢動脈閉塞症、月経困難症、片頭痛、狭心症、急性心筋梗塞、脳梗塞、くも膜下出血、糖尿病性神経障害、リウマチ、緑内障、消化性潰瘍、出産時

の陣痛等のエンドセリン誘発性疾患の疼痛の緩和に有効であることを見出し、発明を完成させた。

ET-1はヒトや実験動物において疼痛を誘発することが報告されている。例えばヒトの上腕動脈にET-1を投与すると虚血性の筋肉痛が惹起される(J. Hypertension, 8, 811-817, 1990)。また、疼痛モデルとして汎用されているマウスホルマリン疼痛モデルにおいて、ET-1がホルマリンによる疼痛の first phase および second phase を有意に増強することが報告されている(Can. J. Physiol. Pharmacol., 75, 596-600, 1997)。本モデルにおいて first phase は知覚神経の直接刺激による疼痛を、second phase は炎症性二次反応による疼痛を意味している(Pain, 38, 247-352, 1989)。

本発明の有効成分は、後記の試験例1に示すようにマウスホルマリン疼痛モデルにおいてET-1による疼痛の増強に対して抑制作用を示した。

また、本発明者はN-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその塩が、造骨性病変の改善及び／又は造骨に伴う疼痛の緩和に有効であることを見出して、発明を完成させた。

破骨細胞抑制作用を有し、骨代謝を改善させるビスホスホネート類は、乳癌の骨転移に伴う骨痛を改善する効果を有することから、長期的な骨病変の改善は骨痛の改善に結びつくと考えられる。前立腺癌患者においては、乳癌骨転移患者と異なり造骨性の骨転移病変が観察されるが(Semin., Oncol., 21, 630-656, 1996)、骨芽細胞に作用して骨代謝を改善させる薬剤は、前立腺癌の骨転移に伴う骨痛を改善する効果を有すると予想される。

ET-1は、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1及びラット頭蓋骨から初代培養した骨芽細胞に対して、ET_A受容体を介して細胞内Ca²⁺濃度の上昇やDNA合成増加、ALP活性低下作用を示すことが報告されている

(Am. J. Physiol., 257, E797-E803, 1989 / Biochem. Biophys. Res. Commun., 170(3), 998-1005, 1990 / Bone, 21(2), 143-146, 1997)。

本発明の有効成分は、後記の試験例 2 に示すようにマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の E T - 1 誘発細胞応答反応に対して抑制作用を示した。

また、本発明者は N - [6 - メトキシ - 5 - (2 - メトキシフェノキシ) - 2 - (2 - ピリミジニル) - 4 - ピリミジニル] - 2 - フェニルエテンスルホンアミドまたはその塩が、前立腺癌の骨転移に伴う疼痛の緩和、或いは、前立腺癌の骨転移による造骨性病変の改善に有効であることを見出して、発明を完成させた。

ヒト前立腺癌細胞株が E T - 1 産生能を有すること (Nat. Med., 1 (9), 944-949, 1995) 及び E T_A 受容体を介して増殖能を示すこと (Cancer Res, 56, 663-668, 1996)、骨転移を有する前立腺癌患者では、骨転移を有さない前立腺癌患者に比べて血漿中 E T - 1 濃度が上昇していること (Nat. Med., 1 (9), 944-949, 1995) が報告されており、これら報告と試験例 1 及び 2 の結果を併せて考えると、本発明の有効成分は、とりわけ、前立腺癌患者の骨転移に伴う疼痛改善、或いは、前立腺癌の骨転移による造骨性病変の改善に有効であることが強く示唆される。更には、本発明の有効成分は後記の試験例 5 に示すように、前立腺癌患者の疼痛スコア及び鎮痛薬の使用量を低下させ、骨代謝マーカーを減少させた。

また、本発明者は N - [6 - メトキシ - 5 - (2 - メトキシフェノキシ) - 2 - (2 - ピリミジニル) - 4 - ピリミジニル] - 2 - フェニルエテンスルホンアミド又はその塩が、前立腺癌の癌細胞増殖抑制に有効であることを見出し発明を完成させた。

本発明の有効成分は、後記の試験例 3 と 4 に示すように、ホルモン非依存性ヒト前立腺癌細胞の E T - 1 による細胞増殖に対し抑制効果を示した。

また、本発明者は N - [6 - メトキシ - 5 - (2 - メトキシフェノキシ) - 2 - (2 - ピリミジニル) - 4 - ピリミジニル] - 2 - フェニルエテンスルホンアミド又はその塩が、前立腺癌の進展抑制に有効であることを見出し発明を完成させた。

本発明の有効成分は、後記の試験例5に示すように、前立腺癌患者の前立腺癌マーカーの増大を抑制、或いは、低下させた。

即ち、本発明は、N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、癌（特に前立腺癌、乳癌、卵巣癌）、関節炎、前立腺炎、神経腫、末梢動脈閉塞症、月経困難症、片頭痛、狭心症、急性心筋梗塞、脑梗塞、くも膜下出血、糖尿病性神経障害、リウマチ、緑内障、消化性潰瘍、出産時の陣痛等のエンドセリン誘発性疾患の疼痛緩和用医薬組成物；造骨性病変の改善用医薬組成物；及び／又は造骨に伴う疼痛緩和用医薬組成物；とりわけ、前立腺癌の骨転移による造骨性病変改善用医薬組成物；及び／又は前立腺癌の骨転移に伴う疼痛緩和用医薬組成物；に関する。

また、本発明は、前立腺癌等のエンドセリン誘発性疾患の疼痛緩和剤；造骨性病変の改善剤；及び／又は造骨に伴う疼痛緩和剤；とりわけ、前立腺癌の骨転移による造骨性病変改善剤；及び／又は前立腺癌の骨転移に伴う疼痛緩和剤；の製造のためのN-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩の使用に関する。

また、本発明は、N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩の治療有効量を患者に投与することを含む、前立腺癌等のエンドセリン誘発性疾患の疼痛；及び／又は造骨に伴う疼痛；とりわけ、前立腺癌の骨転移に伴う疼痛の緩和方法に関する。また、本発明は、N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩の治療有効量を患者に投与することを含む、造骨性病変；とりわけ、前立腺癌の骨転移による造骨性病変の改善方法に関する。

更に、本発明は、N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する前立腺癌の癌細胞増殖抑制用医薬組成物及び／又は前立腺癌の進展抑制用医薬組成物に関する。

また、本発明は、前立腺癌の癌細胞増殖抑制剤及び／又は前立腺癌の進展抑制剤の製造の為のN-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩の使用に関する。

また、本発明は、N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩の治療有効量を患者に投与することを含む、前立腺癌の癌細胞の増殖及び／又は前立腺癌の進展の抑制方法に関する。

尚、本発明の有効成分は特に経口吸収性に優れる為、優れた経口治療薬となりうる。本発明の有効成分は、後記の試験例6に示すように、ヒトに経口投与した時の血漿中濃度は公知E T_A受容体拮抗薬であるABT-627〔1-(N,N-ジブチルカルバモイルメチル)-2(R)-(4-メトキシフェニル)-4(S)-(3,4-メチレンジオキシフェニル)ピロリジン-3(R)-カルボン酸〕の1/2量でAUCが約18倍と顕著に優れている。

以下、本発明を更に詳細に説明する。

本発明の医薬の有効成分は、N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩である。かかる塩とは、前記国際公開第97/22595号に記載された塩が挙げられ、具体的には塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マイレン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、

クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム等の無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン、リジン、オルニチン等の有機塩基との塩やアンモニウム塩等が挙げられる。特に好ましいものとしてカリウム塩が挙げられる。

また、本発明の有効成分には各種異性体の混合物及びその単離されたもの、水和物、溶媒和物の全てが含まれる。また本発明有効成分中には結晶多形を有する化合物もあり、それら結晶形の全てを包含する。

これらの化合物は前記の国際公開第 9 7 / 2 2 5 9 5 号に記載された製法により、或いはそれに準じて容易に入手可能である。

本発明の薬剤は、経口または非経口投与に適した有機又は無機の担体、賦形剤、その他の添加剤を用いて、常法に従って、経口固形製剤、経口液状製剤または注射剤として調製することができる。本発明の医薬の有効成分は優れた経口吸収性を有することから、本発明の薬剤は経口製剤に適する。最も好ましいのは患者が自ら容易に服用でき且つ保存、持ち運びに便利な経口固形製剤である。

経口固形製剤としては、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、徐放剤等が用いられる。このような固形製剤においては、一つ又はそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、デンプン、コーンスターチ、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）のような結合剤；ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、スターチ、タルクのような潤滑剤；繊維素グリコール酸カルシウム、カルメロースカルシウムのような崩壊剤；ラクトースのような安定化剤；グルタミン酸又はアスパラギン酸のような溶解補助剤；ポリエチレングリコールのような可塑剤；酸化チタン、タルク、黄色酸化鉄のような着色剤；を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、寒天、ペクチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフ

タレートなどの糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

経口液状製剤は、製薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

静注、筋注、皮下注などの注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等がある。このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えばラクトース）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保管フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。これらはまた無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

本発明の有効成分化合物の投与量は、投与ルート、疾患の症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して個々の場合に依じて適宜決定されるが、通常経口投与の場合成人1人当たり有効成分約0.1乃至500mg/日、好ましくは1乃至250mg/日であり、これを1回～2回に分けて投与される。

尚、本発明の薬剤は他の疼痛緩和剤と同時にまたは時間をおいて併用することができる。例えば、前立腺癌、乳癌などの癌性疼痛に対しては、WHO方式癌性疼痛治療法で使用されているモルヒネ等の強オピオイド鎮痛薬、ペンタゾシン、ブプレノルフィン等の弱オピオイド鎮痛薬、インドメタシン、イブプロフェン等の非ステロイド性抗炎症鎮痛薬が挙げられる。

更に、本発明の薬剤は、エンドセリン誘発性疾患の治療に用いられる他の薬剤と同時にまたは時間をおいて併用することができる。例えば、本発明の薬剤と併用することが可能である前立腺癌の治療剤として、イホスファミド、テガフル・ウラシル等の抗悪性腫瘍剤、エチニルエストラジオール等の卵胞ホルモン、ヒド

ロコルチゾン、プレドニゾン、ベメタゾン等の副腎皮質ホルモン、酢酸クロルマジノン等の黄体ホルモン、酢酸リユープロレリン等のLH-RH誘導体、酢酸ゴセレリン等のLH-RHアゴニスト、シスプラチン等の抗悪性腫瘍白金錯体化合物、フルタミド等の抗アンドロゲン剤、ホスフェストロール、リン酸エストラムスチンナトリウム等の前立腺癌治療剤、硫酸ペプロマイシン等の抗腫瘍性抗生物質が挙げられる。

図面の簡単な説明

図1は、ホルマリン疼痛に対するET-1による増強作用（A. First Phase、B. Second Phase、C. 浮腫）を示す。

図2は、ホルマリン疼痛のET-1による増強作用に対する化合物1の抑制作用（A. First Phase、B. Second Phase、C. 浮腫）を示す。

図3は、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1のET-1誘発細胞内Ca²⁺濃度上昇に対する化合物1の抑制効果を示す。

図4は、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1のET-1誘発細胞増殖([³H]-thymidine取り込み)に対する化合物1の抑制効果を示す。

図5は、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1のET-1誘発細胞増殖(細胞数)に対する化合物1の抑制効果を示す。

図6はホルモン非依存性ヒト前立腺癌細胞PPC-1のET-1誘発細胞増殖に対する化合物1の抑制効果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例及び試験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例等に限定されるものではない。尚、以下の実施例等において用いる化合物1はN-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミド・カリウム塩を意味する。

実施例1 カプセル錠

表 1

成分名	2mg カプセル	10mg カプセル	20mg カプセル
化合物 1	2.0mg	10mg	20.0mg
乳糖	298.0mg	290.0mg	280.0mg
計	300.0mg	300.0mg	300.0mg

上記成分を混合し、カプセルに充填してカプセル剤を製造した。

試験例 1 マウスホルマリン疼痛モデルの ET-1 による疼痛増強作用に対する化合物 1 の抑制効果

(方法)

①使用動物

実験には、雄性 ICR 系マウス (5 週齢, 日本 SLC) を用いた。

②疼痛反応測定

マウスを観察用ケージに入れ 5 分間以上環境に慣らした後、マウスの左後肢足蹠内に生理食塩水を、右後肢足蹠内に 0.7%ホルマリン含有生理食塩水をそれぞれ 20 μ l ずつ皮下投与した。その直後より出現する licking および biting 反応の持続時間を 5 分ごとに 40 分間計測した。計測終了後、両足首を切断して重量を測定した。ホルマリン投与直後から 5 分間の反応時間を first phase、投与後 10 分から 40 分まで 30 分間の反応時間の総計を second phase として疼痛の指標とした。また右足重量 - 左足重量 (mg) により算出される浮腫を炎症性反応の指標とした。

また Licking 反応時間の計測はすべて 10:00 から 18:00 の間に行った。

③被検薬

ET-1 を含む 0.7% ホルマリン含有生理食塩水を 3, 10, 30pmol/paw の用量で右後肢足蹠内に皮下投与し、ホルマリン疼痛および浮腫に対する ET-1 の増強作用を検討した。

化合物 1 (0.3~3mg/kg) を 1ml/100g の容量で経口投与し、投与後 60 分に ET-1 (10pmol/paw) を含む 0.7%ホルマリン含有生理食塩水を右後肢足蹠内に皮下投与し、ホルマリン疼痛および浮腫の ET-1 誘発の増強作用に対する化合物 1 の効果を検討した。

④統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。二群間の有意差検定は、対応のない student の t 検定により p 値を算出した。多群間の有意差検定は一元配置分散分析で解析し、Dunnett の多重比較により p 値を算出した。p 値が 5%以下の場合を有意とした。

(結果)

①ホルマリン疼痛及び浮腫の ET-1 による増強作用

0.7%ホルマリン溶液をマウス後肢足蹠内に皮下投与することにより 2 相性の疼痛反応が認められた。投与直後から 5 分以内に出現する一過性の疼痛反応 (licking および biting 反応; first phase) と、ホルマリン溶液投与後 20 分前後をピークとする持続性の疼痛反応 (second phase) が認められた。(図 1 A、1 B)。また、0.7%ホルマリン溶液投与により後肢に浮腫が惹起された (図 1 C)。

ホルマリン溶液と ET-1 (3, 10, 30 pmol/paw) を同時に投与すると、first phase、second phase 及び浮腫が用量依存的にかつ有意に増強された (図 1 A、1 B、1 C)。

②ホルマリン疼痛の ET-1 による増強作用に対する被検薬の作用

化合物 1 (0.3, 1, 3mg/kg, p. o.) は、ET-1 (10pmol/paw) 誘発のホルマリン疼痛 (first phase、second phase) 及び浮腫の増強作用を有意に抑制した (図 2 A、2 B、2 C)。

試験例 2 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の ET-1 誘発細胞増殖に対する抑制試験

(方法)

①使用細胞

実験には、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた (Journal of Cell Biology, 96(1), 191-198, 1983)。

②細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

細胞をセルデスク (径 13.5mm) 上に培養し、コンフルエントに達した後、血清非存在下で約 12 時間以上培養後実験に用いた。細胞に Hank's balanced salt

solution(HBSS) (140mM NaCl, 4mM KCl, 1mM K_2HPO_4 , 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 10mM glucose, 20mM Hepes, pH=7.4) 中で Fura 2-AM ($4 \mu M$) を添加して 37℃、1 時間インキュベーションした。HBSS が入った石英セル中にセルデスクを固定し、細胞内 Ca^{2+} 測定装置 (CAF-110) 内に石英セルを装着して 37℃、スターラーによる攪拌条件下で定常状態になってから実験を開始した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、340/380nm 励起波長による 500nm の蛍光強度比を測定し、得られた蛍光強度比から計算式によって細胞内 Ca^{2+} 濃度を算出した (J. Biol. Chem., 260, 3440-3450, 1985)。

③ DNA 合成量測定

DNA 合成量は、 $[^3H]$ ラベルした thymidine の取り込み量を測定した。細胞を 96 穴プレートに FCS 0.2% の培地を用いて 1.5×10^4 cells/well の割合で蒔いて 2 日間培養した。その後溶媒及び ET-1 を加え 24 時間培養した。続いて培養液中に $[^3H\text{-methyl}]\text{-thymidine}$, $0.5 \mu Ci/well$ を添加し 6 時間パルスラベルした。続いて最終濃度 0.2% となるように SDS 溶液を添加し細胞を溶解させた後、DNA 合成に使用された $[^3H\text{-methyl}]\text{-thymidine}$ の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。対照として溶媒を添加した測定値を 100% とし、DNA 合成増加率を算出した。

④ 細胞数測定

細胞数は、Cell Counting Kit (DOJINDO) の試薬溶液を用いて測定した。細胞を 24 穴プレートに FCS 0.5% の培地を用いて 1.0×10^4 cells/well の割合で蒔いて 1 日間培養した。その後溶媒及び ET-1 を加え 72 時間培養した。続いて培養液中に試薬溶液を $100 \mu l/well$ 添加し、37℃、3 時間インキュベーションした。反応後、24 穴プレートの各穴から $200 \mu l$ ずつ 96 穴プレートに移し、吸光度 (波長 405nm、参照波長 650nm) をプレートリーダーで測定した。対照として溶媒を加えた測定値を 100% とし、細胞数増加率を算出した。

⑤ 被検薬

それぞれの実験において、最終濃度として ET-1 $10^{-13} \sim 10^{-6} M$ 、化合物 1 $10^{-12} \sim 10^{-4} M$ の濃度範囲 (いずれも 10 倍比) で実験を行った。化合物 1 は、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定においては ET-1 添加約 2 分前、それ以外の実験においては ET-1 添加約 2

時間前に添加した。

⑥統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。群間の有意差検定は一元配置分散分析で解析し、Dunnet の多重比較により p 値を算出した。p 値が 5%以下の場合を有意とした。各実験の ET-1 の EC_{50} 値および化合物の IC_{50} 値は、Logistic 回帰法により算出した。

(結果)

① MC3T3-E1 の ET-1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する化合物 1 の抑制効果

マウス骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 において、ET-1 ($10^{-12} \sim 10^{-6} M$) は濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた (図 3 A)。ET-1 の EC_{50} 値は $7.39 \times 10^{-9} M$ であった。化合物 1 ($10^{-12} \sim 10^{-6} M$) は、ET-1 ($10^{-8} M$) により誘発された細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用を濃度依存的に抑制した (図 3 B)。化合物 1 の IC_{50} 値は $1.02 \times 10^{-8} M$ であった。

② MC3T3-E1 の ET-1 誘発細胞増殖に対する化合物 1 の抑制効果

マウス骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 において、ET-1 ($10^{-13} \sim 10^{-6} M$) は [3H]-thymidine の取り込みを濃度依存的に有意に上昇させ DNA 合成を増加させた (図 4 A)。ET-1 の EC_{50} 値は $9.84 \times 10^{-12} M$ であった。化合物 1 ($10^{-12} \sim 10^{-6} M$) は、ET-1 ($10^{-10} M$) により誘発された [3H]-thymidine の取り込み上昇作用を濃度依存的に抑制した (図 4 B)。化合物 1 の IC_{50} 値は $1.15 \times 10^{-8} M$ であった。

同様に、WST-1 による細胞数測定実験においても、ET-1 ($10^{-12} \sim 10^{-6} M$) は MC3T3-E1 の細胞数を濃度依存的に有意に上昇させた (図 5 A)。ET-1 の EC_{50} 値は $2.20 \times 10^{-11} M$ であった。化合物 1 ($10^{-11} \sim 10^{-6} M$) は、ET-1 ($10^{-9} M$) により誘発された細胞数上昇作用を濃度依存的に抑制した (図 5 B)。化合物 1 の IC_{50} 値は $9.54 \times 10^{-9} M$ であった。

試験例 3 ホルモン非依存性ヒト前立腺癌細胞の ET-1 誘発細胞増殖に対する抑制試験 (1)

(方法)

①使用細胞

実験にはホルモン非依存性ヒト前立腺癌細胞株である PPC-1 を用いた (International Journal of Cancer, 44, 898-903, 1989)。

② PPC-1 細胞増殖に対する ET-1 の作用および被検薬による増殖抑制効果の検討

細胞増殖の指標として DNA 合成量を測定した。DNA 合成量は、 $[^3\text{H}]$ ラベルした thymidine の取り込み量を測定した。細胞を 96 穴プレートに FCS 無添加の培地を用いて 1×10^4 cells/well の割合で蒔いて 5 日間培養した。その後溶媒及び ET-1 を加え 24 時間培養した。続いて培養液中に $[^3\text{H-methyl}]\text{-thymidine}$, $0.5 \mu\text{Ci/well}$ を添加し 6 時間パルスラベルした。続いて最終濃度 0.2 % となるように SDS 溶液を添加し細胞を溶解させた後、DNA 合成に使用された $[^3\text{H-methyl}]\text{-thymidine}$ の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。対照として溶媒を添加した測定値を 100% とし、DNA 合成増加率を算出した。

③被検薬

本実験において、最終濃度として ET-1 $10^{-13} \sim 10^{-6} \text{M}$ (10 倍比)、化合物 1 $10^{-10} \sim 3 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度範囲 (3 倍比) で実験を行った。化合物 1 は、ET-1 添加約 2 時間前に添加した。

④統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。群間の有意差検定は一元配置分散分析で解析し、Dunnett の多重比較により p 値を算出した。p 値が 5% 以下の場合を有意とした。化合物 1 の IC_{50} 値は logistic 回帰法により算出した。

(結果)

図 6 A に示すように、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞株 PPC-1 において、ET-1 ($10^{-13} \sim 10^{-6} \text{M}$) は濃度依存的に $[^3\text{H}]\text{-thymidine}$ の取り込みを上昇させ、細胞増殖促進作用を示した。ET-1 の作用は 10^{-8}M 以上で有意であった。

化合物 1 ($10^{-10} \sim 3 \times 10^{-6} \text{M}$) は ET-1 (10^{-8}M) で誘発される PPC-1 細胞増殖促進を濃度依存的に抑制し、 IC_{50} 値は $28 \pm 9.8 \text{ nM}$ であった (図 6 B)。化合物 1 の抑制作用は $3 \times 10^{-7} \text{M}$ 以上で有意であった。

試験例 4 ホルモン非依存性ヒト前立腺癌細胞の ET-1 誘発細胞増殖に対する抑制試験 (2)

(方法)

①使用細胞

実験にはホルモン非依存性ヒト前立腺癌細胞株である PPC-1 を用いた (International Journal of Cancer, 44, 898-903, 1989)。

② ET-1 による増殖反応および被検薬による ET-1 誘発増殖抑制効果の検討

細胞数は、alar blue の試験溶液を用いて測定した。24well プレートに細胞を 2×10^4 cells/well 蒔き込み、接着後培地を FCS 非添加の培地に変換してさらに 24 時間培養した。その後溶媒及び ET-1 を ($10^{-11} \sim 10^{-6}$ M) 添加し、96 時間培養した。培地の最終容量は 500 μ l とし、培養液中に alamar blue を 50 μ l 添加し 4 時間インキュベーションした。反応後 24well プレートの各穴から反応液を 100 μ l 採取し、96well プレートに移しかえ、吸光度 (波長 405nm, 参照波長 650nm) をプレートリーダーで測定した。対照として溶媒を加えた測定値を 100% とし、細胞数増加率を算出した。

化合物の抑制効果の検討には、化合物 1 を $10^{-9} \sim 10^{-5}$ M の最終濃度で、ET-1 を 10^{-7} M 添加 30 分前に添加した。

また本実験において ET-1 の崩壊が懸念されたため、刺激後 48 時間で新しい ET-1 添加培地と交換した。

(結果)

表 2 に示すように、ET-1 は 10^{-11} M から ET-1 による PPC-1 の細胞増殖作用が観察された。

表 2

ET-1 (M)	細胞増殖 (%)
0 (対照)	100.0
10^{-11}	119.6
10^{-10}	122.3
10^{-9}	124.0
10^{-8}	115.3
10^{-7}	119.3

(n=7)

また、表 3 に示すように化合物 1 は 10^{-6}M から ET-1 10^{-7}M による PPC-1 の細胞増殖を抑制した。

表 3

ET-1	化合物 1	細胞増殖 (%)
-	-	100.0
10^{-7}M	0	110.5
	10^{-6}M	99.2
	10^{-5}M	98.1

(n=7)

試験例 5 前立腺癌患者に対する臨床試験

(方法)

前立腺癌患者に対する臨床試験は以下の条件で行った。

対象：ホルモン非依存性の又は抗アンドロゲン療法後に再発したステージ D 2 の

前立腺癌患者 18 名 (45 歳以上)

被検薬：化合物 1

剤形：2、10 及び 40 mg 錠

用量：2、4、10、20、60、120 及び 240 mg/日 (1 日 1 又は 2 回

投与)

投与期間：4 週間 (28 日)

評価指標：以下の項目を投与前後に測定した。

①前立腺特異抗原 (PSA)

②骨マーカー (骨アルカリフォスファターゼ又はデオキシピリジノリン)

③骨疼痛 (疼痛スコア VAS (visual analogue scale) の変化/鎮痛薬の使用
用量の変化)

(結果)

化合物 1 は 2 mg/日の用量から各効果指標の改善が認められた。化合物 1 は、患者 18 名中 9 名の疼痛スコア VAS を改善させた。化合物 1 は患者 18 名中 4 名の鎮痛薬の使用量を低下させた。化合物 1 は患者 10 名の前立腺癌マーカー P

SAを改善させ、2名のPSAを維持させた。化合物1は患者18名中11名の骨代謝マーカー骨アルカリフォスファターゼを減少させ、患者18名中14名の骨代謝マーカーデオキシピリジノリン/クレアチニン比を約40%改善させた。

試験例6 ヒトに経口投与した時の血漿中濃度

(方法)

化合物1の経口投与時の薬物動態、忍容性および安全性を評価する目的で前立腺摘出手術を施行した進行性前立腺癌患者3名を対象として化合物1を10mg単回投与した。化合物1の血漿中未変化体濃度を測定するために、投与前ならびに投与後30分、1時間、1時間30分、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、36時間及び48時間の各時点でヘパリンリチウムを含むポリエチレンチューブに血液を6mlずつ採取し、速やかに遠心分離(4℃, 10分間, 3500rpm)して血漿を得た。血漿サンプルは濃度測定までマイナス70℃にて冷凍保存した。血漿中濃度はLC-MS/MS法を用いて測定した。

(結果)

表4に示す通り、化合物1を10mg単回経口投与時のCmax及びAUCは、ABT-627を20mg投与時と比べて各々約11倍及び約18倍高い値を示した。

表4

	AUC (ng·h/ml)	C max (ng/ml)	T max (h)	T _{1/2} (h)
化合物1 10 mg	14700	1000	2	13
ABT-627 20 mg	*802	*93.5	*0.6	*28.4
化合物1 (10mg)/ABT-627 (20mg)	18	11		

*)6th International Conference on Endothelin, Oct 10-13, 1999, abstract No. 219

試験例1の結果から、化合物1がエンドセリン誘発性の疾患の疼痛緩和剤として有用であることが確認された。

試験例2の結果から、化合物1が造骨性の骨病変を改善し、造骨に伴う疼痛緩和剤として有用であることが確認された。

また試験例2において、ET-1は 1×10^{-11} M程度の非常に低濃度から骨芽様細胞

の細胞応答を引き起こすことが示された。ヒト前立腺癌細胞株の ET-1 産生能に関する報告では約数十 pg/ml 10^6 cells/24hr の ET-1 産生が報告されている (Nat. Med., 1 (9), 944-949, 1995)。この濃度は約 1×10^{-11} M にあたり、試験例 2 の結果は、前立腺癌の骨転移患者の骨転移部位において、前立腺癌細胞から産生された ET-1 が造骨性の骨病変を形成しうる可能性を強く示唆する知見である。試験例 2 において、化合物 1 は、10nM 付近の低濃度で骨芽様細胞の ET-1 による細胞応答を抑制することが示された。よって化合物 1 は、ET-1 の関与が示唆されている前立腺癌患者の造骨性骨病変に対して改善効果を示すことが強く示唆された。更に試験例 1 の結果を併せて考えると、化合物 1 は、前立腺癌の骨転移に伴う疼痛緩和剤として有用であることが強く示唆された。

また、試験例 5 の結果によっても、化合物 1 が前立腺癌の骨転移に伴う疼痛緩和剤として有用であることが確認された。

試験例 3 及び 4 の結果から、化合物 1 がホルモン抵抗性の前立腺癌の癌細胞増殖抑制剤として有用であることが確認され、化合物 1 は前立腺癌の進展抑制効果を示すことが強く示唆された。

また、試験例 5 の結果によっても、化合物 1 が前立腺癌の進展抑制剤として有効であることが確認された。

更には、試験例 6 において、化合物 1 は公知 ET_A 受容体拮抗剤として知られる ABT-627 の 1/2 の用量で AUC が約 1.8 倍と高く、化合物 1 の経口投与時の経口吸収性及び薬物動態は特に優れていることが示唆された。ヒト ET_A 受容体に対する親和性 (K_i 値) は化合物 1 が 0.697nM (WO97/22595)、ABT-627 が 0.48nM (J. Pharmacol. Exp. Ther., 276, 473-481, 1996) とほぼ同等であるが、化合物 1 は ABT-627 よりも優れた経口治療薬として期待される。

また、試験例 5 において、化合物 1 は 2mg の用量から有効性を示し、これは前立腺癌患者に対して 10mg の用量から有意な疼痛改善が報告された ABT-627 (Proceedings of ASCO, Vol. 19, 1314, 2000) の 1/5 の量であり、化合物 1 は前

立腺癌の優れた経口治療薬であることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、臨床において有効な優れた前立腺癌の経口治療薬を提供できる。即ち、癌（特に前立腺癌、乳癌）、関節炎、前立腺炎、神経膠腫、末梢動脈閉塞症、月経困難症、片頭痛、狭心症、急性心筋梗塞、脑梗塞、くも膜下出血、糖尿病性神経障害、リウマチ、緑内障、消化性潰瘍、出産時の陣痛等のエンドセリン誘発性疾患の疼痛緩和薬を提供することができる。また、造骨性病変の改善薬及び／又は造骨に伴う疼痛緩和薬、とりわけ、前立腺癌の骨転移による造骨性病変改善薬及び／又は前立腺癌の骨転移に伴う疼痛緩和薬を提供することができる。更に、前立腺癌の癌細胞増殖抑制薬及び／又は前立腺癌の進展抑制薬を提供することができる。

請 求 の 範 囲

1. N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有するエンドセリン誘発性疾患の疼痛緩和用医薬組成物。
2. エンドセリン誘発性疾患が前立腺癌である請求の範囲1記載の医薬組成物。
3. N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミド又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する造骨性病変の改善用医薬組成物。
4. N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミド又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する造骨に伴う疼痛緩和用医薬組成物。
5. N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミド又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する前立腺癌の骨転移に伴う疼痛緩和用医薬組成物。
6. N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミド又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する前立腺癌の骨転移による造骨性病変の改善用医薬組成物。
7. N-[6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル]-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する前立腺癌の癌細胞増殖抑制用医薬組成物。
8. 前立腺癌がホルモン非依存性前立腺癌である請求の範囲7記載の癌細胞増殖

抑制用医薬組成物。

9. N-〔6-メトキシ-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(2-ピリミジニル)-4-ピリミジニル〕-2-フェニルエテンスルホンアミドまたはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する前立腺癌の進展抑制用医薬組成物。

図 1

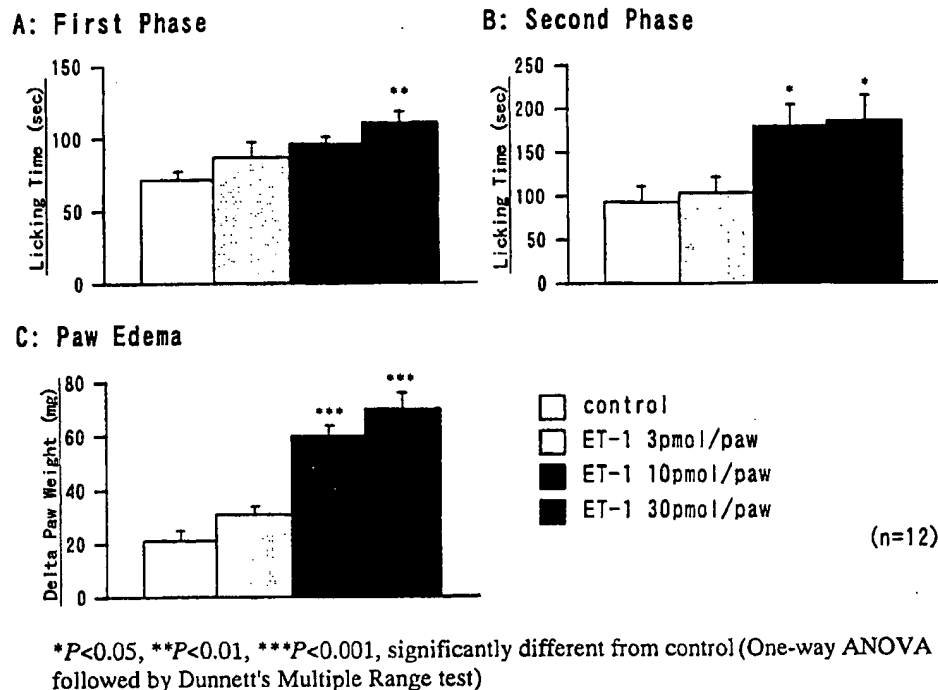


図 2

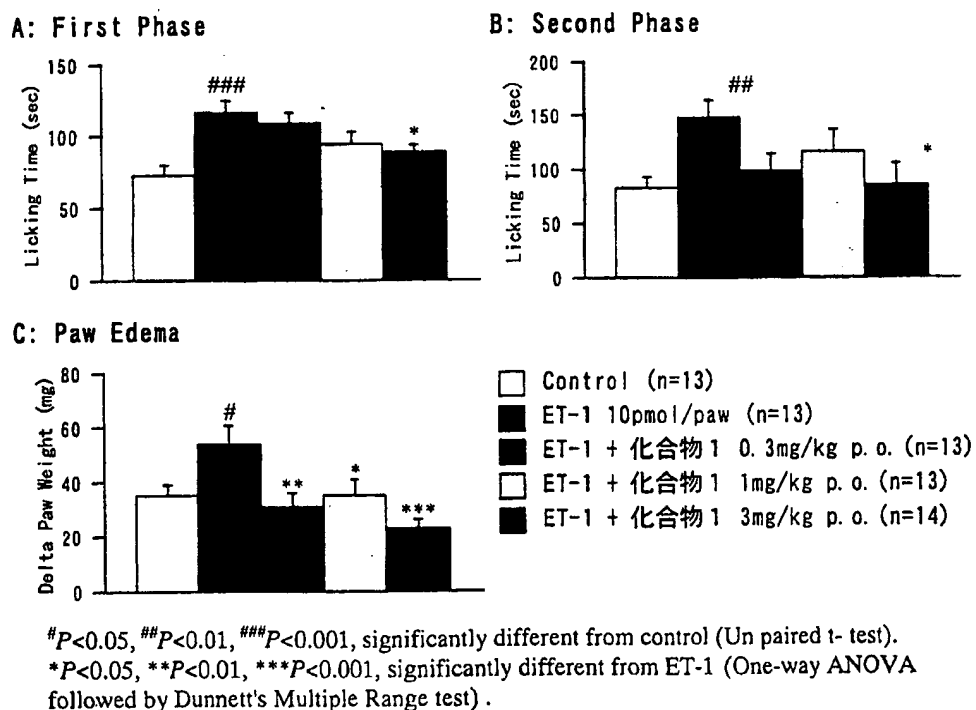


図 3

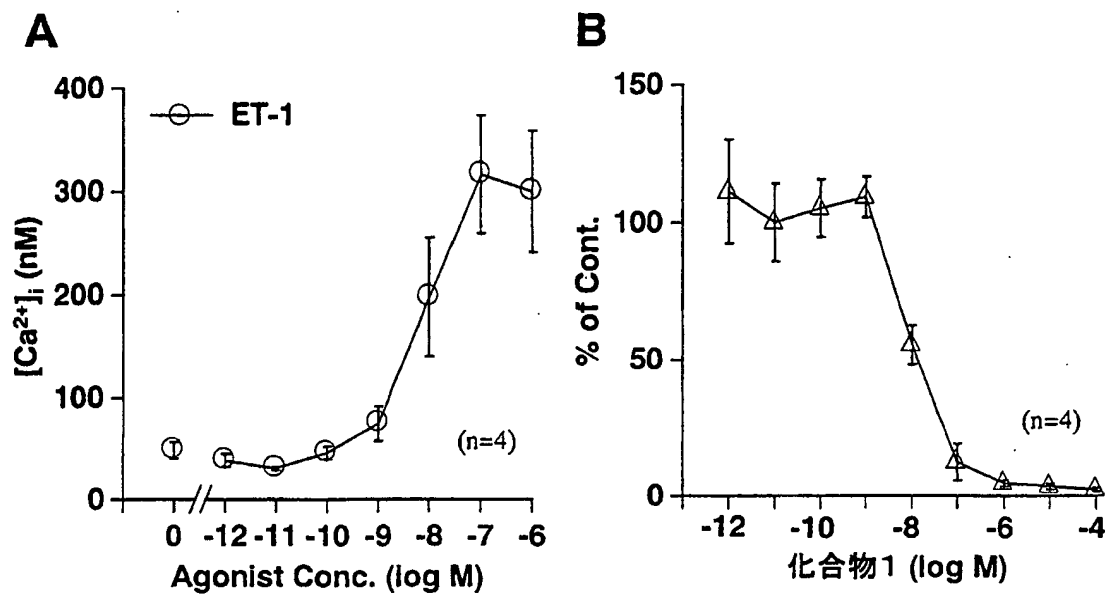


図 4

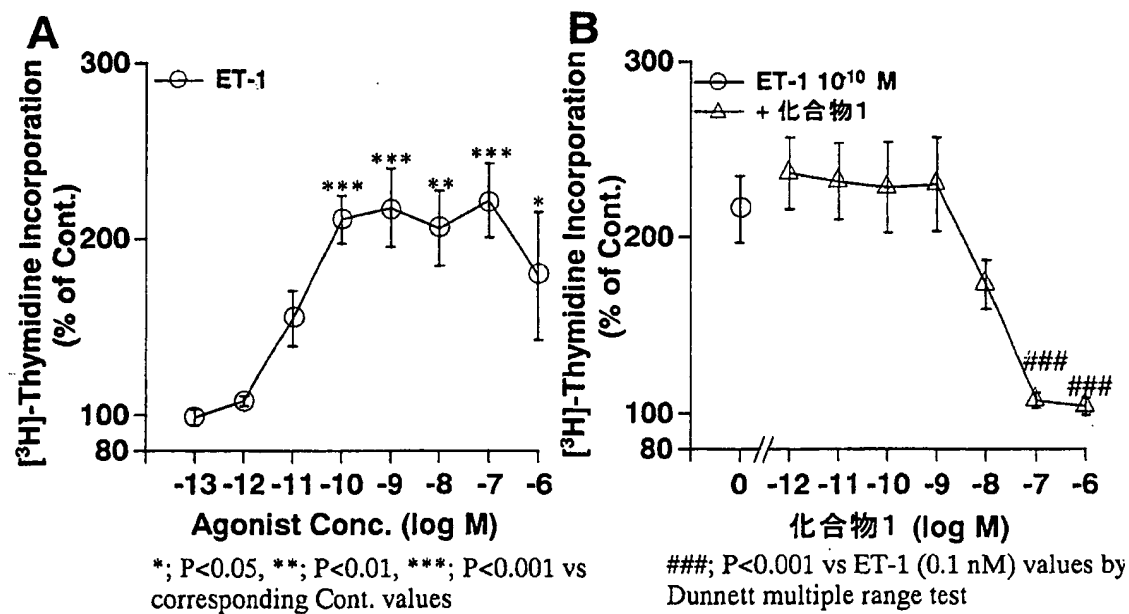


図 5

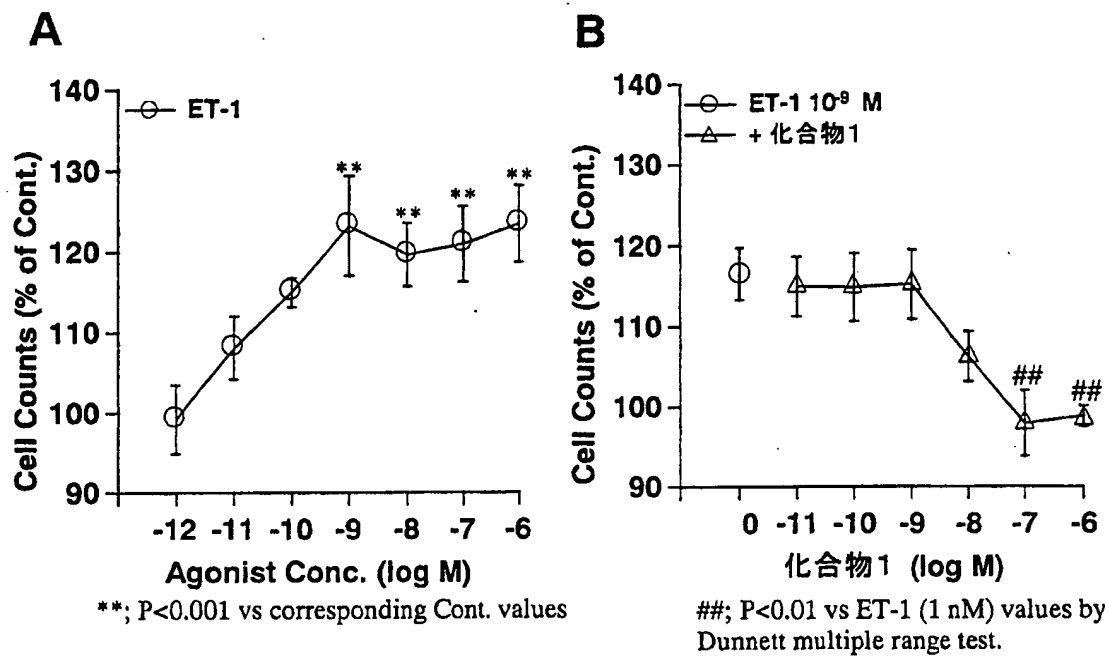
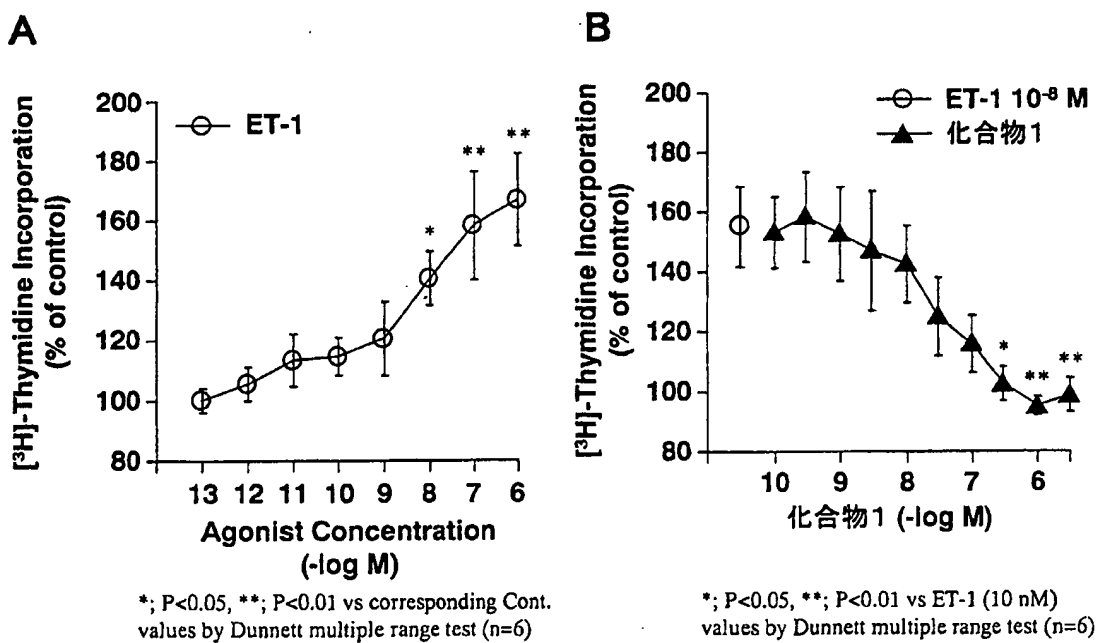


図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K31/505, A61P35/00// C07D239/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K31/505, C07D239/46, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS, REGISTRY, MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/22595, A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 26 June, 1997 (26.06.97), page 49, Table 7, Ex.2, compound; Claims 9,10 & EP, 882719, A1 & CN, 1204326, A & BR, 9612061 & JP, 3087968, B2 & US 6083955, A	1-9
Y	WO, 99/56761, A1 (DAVAR, Gudarz), 11 November, 1999 (11.11.99), Full text (Family: none)	1-9
Y	WO, 98/41206, A1 (BASF AKTIENGESELLSCHAFT), 24 September, 1998 (24.09.98), page 34, last line to page 40, line 20; Claims 1-12 & US, 6030975, A & AU, 9866946, A1 & EP, 969841, A1 & BR, 9808263, A & NO, 9904426, A	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 January, 2001 (23.01.01)Date of mailing of the international search report
06 February, 2001 (06.02.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/505, A61P35/00// C07D239/46

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/505, C07D239/46, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS, REGISTRY, MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 97/22595, A1 (山之内製薬株式会社) 26.6月.1997(26.06.97) 49頁表7のEx. 2の化合物、及び請求の範囲9, 10参照。 & EP, 882719, A1 & CN, 1204326, A & BR, 9612061 & JP, 3087968, B2 & US 6083955, A	1-9
Y	WO, 99/56761, A1 (DAVAR, Gudarz) 11.11月.1999 (11.11.99) 全文献参照。(ファミリーなし)	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.01.01

国際調査報告の発送日

06.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

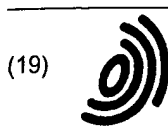
横尾 俊一

4P

7822

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 98/41206, A1 (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 24.9月.1998(24.09.98) 34頁末行～40頁20行、及び請求の範囲1-12参照。 & US, 6030975, A & AU, 9866946, A1 & EP, 969841, A1 & BR, 9808263, A & NO, 9904426, A	1 - 9



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 256 344 A1**

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**
published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:
13.11.2002 Bulletin 2002/46

(51) Int Cl.7: **A61K 31/505**, A61P 35/00
// C07D239:46

(21) Application number: **00970160.8**

(86) International application number:
PCT/JP00/07573

(22) Date of filing: **27.10.2000**

(87) International publication number:
WO 01/060370 (23.08.2001 Gazette 2001/34)

(84) Designated Contracting States:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Designated Extension States:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priority: **16.02.2000 JP 2000037313**
16.02.2000 JP 2000037314

(71) Applicant: **YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL
CO. LTD.**
Tokyo 103-8411 (JP)

(72) Inventors:
• **YUYAMA, Hironori**
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
• **FUJIMORI, Akira**
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)

- **SANAGI, Masanao**
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- **HARADA, Hironori**
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- **KOAKUTSU, Akiko**
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- **MORI, Mikiko**
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- **YAMAMOTO, Nobuyuki**
Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd
Itabashi-ku, Tokyo 174-8612 (JP)

(74) Representative: **HOFFMANN - EITLE**
Patent- und Rechtsanwälte
Arabellastrasse 4
81925 München (DE)

(54) **REMEDIES FOR ENDOTHELIN-INDUCED DISEASES**

(57) A pharmaceutical composition for therapeutically treating prostate cancer, the pharmaceutical composition containing N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective component.

EP 1 256 344 A1

Description

Technical Field

[0001] The present invention relates to a pharmaceutical drug; more specifically, the invention relates to a therapeutic agent for reducing pain in an endothelin-induced disease, such as prostate cancer; a therapeutic agent for ameliorating osteogenic disorders and/or a therapeutic agent for reducing pain involved in osteogenesis; a therapeutic agent for reducing pain involved in the bone metastasis of prostate cancer and/or a therapeutic agent for ameliorating osteogenic disorders due to the bone metastasis of prostate cancer; a therapeutic agent for suppressing the growth of the cancer cell of prostate cancer; or a therapeutic agent for suppressing the progress of prostate cancer.

Background of the Invention

[0002] N-[6-Methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a salt thereof is described in the International Patent Publication No. 97/22595. The actions thereof to suppress ET-1 binding to endothelin ET_A receptor and to suppress ET-1 induced vascular constriction and blood pressure elevation are disclosed therein, indicating that the compound or a salt thereof can be used for treating various diseases primarily including cardiovascular diseases, for which endothelin is responsible.

[0003] For the purpose of creating a new therapeutic agent, the present inventors have made more detailed investigations about a possibility of the application of N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a salt thereof to the treatment of diseases.

Disclosure of the Invention

[0004] Consequently, the inventors have found that N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a salt thereof is effective for the reduction of pains of endothelin-induced diseases, such as cancer (particularly, prostate cancer, breast cancer, ovarian cancer), arthritis, prostatitis, glioma, peripheral artery occlusion, dysmenorrhea, migraine headache, angina, acute cardiac infarction, cerebral infarction, subarachnoid hemorrhage, diabetic nervous disorders, rheumatoid arthritis, glaucoma, gastric ulcer and labor during delivery. Thus, the invention has been achieved.

[0005] It is reported that ET-1 induces pain in humans and experimental animals. For example, ET-1 administered to human brachial artery induces ischemic muscular pain (J.Hypertension,8,811-817,1990). Additionally, it is reported that ET-1 significantly enhances the first and second phases of pain due to formalin in the mouse formalin pain model commonly used as a pain model. (Can.J.Physiol.Pharmacol.,75,596-600,1997). In the model, the first phase means pain due to direct stimulation of sensory nerve, while the second phase means pain due to inflammatory secondary reaction (Pain,38,247-352,1989).

[0006] As shown in the following Test Example 1, The effective component of the invention exerted an action to suppress the enhancement of pain induced by ET-1 in the mouse formalin pain model.

[0007] Further, the inventors have found that N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a salt thereof is effective for the amelioration of osteogenic disorders and/or the reduction of pain involved in osteogenesis. Thus, the invention has been achieved.

[0008] Because bisphosphonates with an action to suppress osteoclast and thereby ameliorate bone metabolism have an effect to ameliorate bone pain involved in the bone metastasis of breast cancer, the amelioration of long-term bone disorders is believed to lead to the amelioration of bone pain. Unlike breast cancer patients with bone metastasis, osteogenic disorders due to bone metastasis are observed in patients with prostate cancer (Semin.,Oncol., 21,630-656,1996), and drugs with an action on osteoblast to thereby ameliorate bone metabolism probably have an effect to ameliorate bone pain involved in the bone metastasis of prostate cancer.

[0009] It is reported that ET-1 exerts actions to increase intracellular Ca²⁺ concentration and DNA synthesis and to reduce ALP activity through ET_A receptors in MC3T3-E1, mouse osteoblast-like cells, and osteoblast primarily cultured from a rat calvaria (Am.J.Physiol.,257,E797-E803,1989/Biochem.Biophys.Res.Commun.,170(3), 998-1005,1990/Bone,21(2),143-146,1997).

[0010] As shown in the following Test Example 2, The effective component of the invention exerted an action to suppress the ET-1-induced cell response reactions of the MC3T3-E1, mouse osteoblast-like cells.

[0011] Further, the inventors have found that N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a salt thereof is effective for the amelioration of osteogenic disorders due to the bone metastasis of prostate cancer and/or the reduction of pain involved in the bone metastasis of prostate cancer. Thus, the invention has been achieved.

[0012] It is reported that a human prostate cancer cell line has a potency to generate ET-1 (Nat.Med.,1(9),

944-949,1995) and the growth potency is exerted through ET_A receptors (Cancer Res.,56,663-668,1996) and that the plasma ET-1 concentration in prostate cancer patients with bone metastasis is elevated, compared with the ET-1 concentration in prostate cancer patients without bone metastasis (Nat.Med.,1(9),944-949,1995). Taking account of these reports together with the results of Test Examples 1 and 2, the effective component of the invention is believed to be particularly effective for the amelioration of osteogenic disorders due to the bone metastasis in prostate cancer patients and/or the reduction of pain involved in the bone metastasis of prostate cancer patients. Additionally, as shown in the following Test Example 5, the effective component of the invention reduced pain score and use of analgesics in prostate cancer patients, and decreased bone metabolism markers in prostate cancer patients.

[0013] Further, the inventors have found that N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a salt thereof is effective for the suppression of the growth of the cancer cell of prostate cancer. Thus, the invention has been achieved.

[0014] As shown in the following Test Example 3 and 4, The effective component of the invention suppressed cell growth of hormone-refractory human prostate cancer cell induced by ET-1.

[0015] Further, the inventors have found that N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a salt thereof is effective for the suppression of the progress of prostate cancer. Thus, the invention has been achieved.

[0016] As shown in the following Test Example 5, The effective component of the invention stabilized or decreased Prostate cancer marker PSA in prostate cancer patients.

[0017] In other words, the invention relates to a pharmaceutical composition for reducing pain in endothelin-induced diseases, such as cancer (particularly, prostate cancer, breast cancer, ovarian cancer), arthritis, prostatitis, glioma, peripheral artery occlusion, dysmenorrhea, migraine headache, angina, acute cardiac infarction, cerebral infarction, subarachnoid hemorrhage, diabetic nervous disorders, rheumatoid arthritis, glaucoma, gastric ulcer and labor during delivery; a pharmaceutical composition for ameliorating osteogenic disorders; and/or a pharmaceutical composition for reducing pain involved in osteogenesis, particularly a pharmaceutical composition for ameliorating osteogenic disorders due to the bone metastasis of prostate cancer; and/or a pharmaceutical composition for reducing pain involved in the bone metastasis of prostate cancer, the aforementioned compositions containing N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective components.

[0018] Additionally, the invention relates to the use of N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the manufacture of a medicament for reducing pain of endothelin-induced diseases such as prostate cancer; a medicament for ameliorating osteogenic disorders; and/or a medicament for reducing pain involved in osteogenesis, particularly a medicament for ameliorating osteogenic disorders due to the bone metastasis of prostate cancer; and/or a medicament for reducing pain involved in the bone metastasis of prostate cancer.

[0019] Additionally, the invention relates to a method for reducing pain of endothelin-induced diseases such as prostate cancer and/or pain involved in osteogenesis, particularly pain involved in the bone metastasis of prostate cancer, comprising administering a therapeutically effective dose of N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof to such patients. Still additionally, the invention relates to a method for ameliorating osteogenic disorders, particularly osteogenic disorders due to the bone metastasis of prostate cancer, comprising administering a therapeutically effective dose of N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof to such patients.

[0020] The invention relates to a pharmaceutical composition for suppressing the growth of the cancer cell of prostate cancer and/or a pharmaceutical composition for suppressing the progress of prostate cancer, the compositions containing N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective components.

[0021] Additionally, the invention relates to the use of N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the manufacture of a medicament for suppressing the growth of the cancer cell of prostate cancer and/or a medicament for suppressing the progress of prostate cancer.

[0022] Further, the invention relates to a method for suppressing the growth of the cancer cell of prostate cancer, comprising administering a therapeutically effective dose of N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof to such patients. Furthermore, the invention relates to a method for suppressing the progress of prostate cancer, comprising administering a therapeutically effective dose of N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof to such patients.

[0023] Because The effective component of the invention is particularly excellent in terms of oral absorptivity, the compound can be modified into an excellent oral therapeutic agent. As shown in the following Test Example 6, the

plasma concentration thereof when orally administered to humans at a dose 1/2-fold that of ABT-627 [1-(N,N-dibutyl-carbamoylmethyl)-2(R)-(4-methoxyphenyl)-4(S)-(3,4-methylenedioxyphenyl)pyrrolidine-3(R)-carboxylic acid] as a known ET_A receptor antagonist is prominently great with AUC of about 18-fold.

[0024] The invention is described in more detail hereinbelow.

[0025] The effective component of the inventive pharmaceutical composition is N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfoneamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Such salt includes the salt described in the International Patent Publication No. 97/22595 and its specific examples are acid addition salt such as a salt with inorganic acid (for example, hydrochloric acid, hydrobromic acid, hydroiodic acid, sulfuric acid, nitric acid and phosphoric acid) or organic acid (for example, formic acid, acetic acid, propionic acid, oxalic acid, malonic acid, succinic acid, fumaric acid, maleic acid, lactic acid, malic acid, tartaric acid, citric acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, aspartic acid and glutamic acid) and a salt with base such as inorganic base (for example, sodium, potassium, magnesium, calcium and aluminum) and organic base (for example, methylamine, ethylamine, ethanolamine, lysine and ornithine) as well as ammonium salt. Particularly preferable is the potassium salt thereof.

[0026] The effective component of the invention includes all of mixtures of various isomers thereof and isolated various isomers thereof, hydrated products thereof and solvated products thereof. Additionally, the inventive effective component is sometimes of crystal polymorphism, so the inventive effective component includes all the crystals thereof.

[0027] These compounds are readily available by the production method described in the International Patent Publication No. 97/22595 or according to the production method.

[0028] The drug of the invention can be prepared as oral solid dosage form, oral liquid dosage form or injection, by using organic or inorganic carriers, excipients and other additives suitable for oral or parenteral administration, according to routine methods. Owing to the great oral absorptivity of the effective component of the invention, the drug of the invention is suitable for oral dosage form. The most preferable is an oral solid dosage form, which can be readily incorporated by patients by themselves and are convenient for storage and transfer.

[0029] The oral solid dosage form includes tablet, powder, fine particle, granule, capsule, pill and sustained-release type. In such solid dosage forms, one or more active substances are mixed with at least one inactive diluent, for example lactose, mannitol, glucose, micro-fine cellulose, starch, cornstarch, polyvinylpyrrolidone and metasilicate aluminate magnesium. According to routine methods, the composition may satisfactorily contain additives other than inactive diluents, including for example binders such as hydroxypropyl cellulose and hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC); lubricants such as magnesium stearate, polyethylene glycol, starch and talc; disintegrators such as fibrinogen calcium glycolate and cermellose calcium; stabilizers such as lactose; dissolution auxiliary agents such as glutamic acid or aspartic acid; plasticizers such as polyethylene glycol; and colorants such as titanium oxide, talc and yellow ferric oxide. If necessary, the resulting tablet or pill may satisfactorily be coated with sugar coating or films comprising substances solubilizable in stomach or intestine, such as sucrose, gelatin, agar, pectin, hydroxypropyl cellulose and hydroxypropylmethyl cellulose phthalate.

[0030] The oral liquid dosage form includes pharmaceutically acceptable emulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs and contains inactive diluents for general use, for example distilled water and ethanol. Other than inactive diluents, the composition may satisfactorily contain auxiliary agents such as moisturizers and suspending agents, sweeteners, flavor, fragrance, and preservatives.

[0031] Injections for intravenous, intra-muscular and subcutaneous injection include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions and emulsions. The diluents for the aqueous solutions and suspensions include for example distilled water for injections and physiological saline. The diluents for the non-aqueous solutions and suspensions include for example propylene glycol, polyethylene glycol and vegetable oils such as olive oil, alcohols such as ethanol and polysorbate 80. Such composition may additionally contain auxiliary agents such as preservatives, moisturizers, dispersants, stabilizers (for example, lactose), and dissolution auxiliary agents (for example, glutamic acid, aspartic acid). These are sterilized by filtration through bacteria trapping filters or blending with sterilizing agents or under irradiation. These may satisfactorily be used to produce sterile solid compositions, which are dissolved in sterile water or sterile solvents for injections prior to use, and are then used.

[0032] The dose of the compound as the effective component of the invention is appropriately determined, depending on each case, taking account of dosage route, diseased conditions, and the age and sex of a dosing subject, but for general administration, the dose of the effective component is about 0.1 to 500 mg/day, preferably 1 to 250 mg/day, per one adult, which is then administered in two-dividend portions.

[0033] Herein, the inventive drug can be used in combination with other pain reducing agents, simultaneously or separately in terms of dosing time. For cancerous pain due to prostate cancer and breast cancer, for example, the pain reducing agents include strong opioid analgesics such as morphine for use in the WHO therapeutic mode of cancerous pain, weak opioid analgesics such as pentazocine and buprenorphine, and non-steroidal anti-inflammatory analgesics such as indometacin and ibuprofen.

[0034] The inventive drug can be used in combination with other drugs for the therapy of endothelin-induced diseases,

simultaneously or separately in terms of dosing time. Therapeutic agents of prostate cancer, which can be used in combination with the inventive drug, include anti-malignant tumor agents such as ifosfamide, tegafur, uracil, estrogen such as ethynylestradiol, adrenal cortex hormones such as hydrocortisone, prednisolone and bemethazone, progesterone such as chlorpromazine acetate, LH-RH derivatives such as leuporelin acetate, LH-RH agonists such as goserelin acetate, anti-malignant tumor platinum complex compounds such as cisplatin, anti-androgen agents such as flutamide, therapeutic agents of prostate cancer, such as fosfestrol and sodium phosphate estramustine, and anti-tumor antibiotics such as peplomycin sulfate.

Brief Description of the Drawings

[0035]

Fig. 1 depicts the ET-1-induced enhancement of formalin-induced pain (A: first phase; B: second phase; C: edema); Fig. 2 depicts the suppressive effects of Compound 1 on the ET-1-induced enhancements of formalin-induced pain (A: first phase; B: second phase; C: edema); Fig. 3 depicts the suppressive effect of Compound 1 on the increase of ET-1-induced intracellular Ca^{2+} concentration in MC3T3-E1, mouse osteoblast-like cells; Fig. 4 depicts the suppressive effect of Compound 1 on the increase of ET-1-induced cell growth (^3H -thymidine incorporation) in MC3T3-E1, mouse osteoblast-like cells; Fig. 5 depicts the suppressive effect of Compound 1 on the increase of ET-1-induced cell growth (cell number) in MC3T3-E1, mouse osteoblast-like cells; and Fig. 6 depicts the suppressive effect of Compound 1 on the increase of ET-1-induced cell growth in PPC-1, hormone-refractory human prostate cancer cells.

Best Mode for Carrying out the Invention

[0036] The invention will be described in more detail hereinbelow with reference to Examples and Test Examples, but the invention is not limited to these Examples and the like. The Compound 1 used in the following Examples and the like means N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide potassium salt.

Example 1

Capsules

[0037]

Table 1

Component name	2 mg Capsule	10 mg Capsule	20 mg Capsule
Compound 1	2.0 mg	10 mg	20.0 mg
Lactose	298.0 mg	290.0 mg	280.0 mg
Total	300.0 mg	300.0 mg	300.0 mg

[0038] The components were mixed together and filled in capsules, to prepare capsules.

Test Example 1

Suppressive effects of Compound 1 to the enhancement of pain responses induced by ET-1 in mouse formalin-induced pain model

(Method)

1. Animal used

[0039] Male ICR mice (age of 5 weeks; Nippon SLC) were used in these experiments.

2. Measurement of pain responses

[0040] The mice were placed in a cage for observation, to acclimate the mice to the environment for 5 minutes or longer; then, physiological saline of 20 μ l was subcutaneously injected to the mouse left hind paws, while 0.7 % formalin-containing physiological saline of 20 μ l was subcutaneously injected to the mouse right hind paws. The duration of licking and biting reactions emerging immediately thereafter was counted every 5 minutes, for 40 minutes. After the termination of the counting, both the ankles were amputated and weighed. The reaction time immediately after formalin injection to 5 minutes later was defined as first phase; and the 30 minutes reaction time from 10 minutes after injection until 40 minutes later was defined in total as second phase, which were used as the indices of pain. Additionally, the edema calculated on the basis of the right foot weight minus the left foot weight (in mg) was used as an index of inflammatory reaction. Additionally, in all cases the licking reaction time was counted between 10:00 and 18:00.

3. Test drugs

[0041] 0.7 % formalin-containing physiological saline containing ET-1 at doses of 3, 10 and 30 pmol/paw was subcutaneously injected in the right hind paws to examine the action of ET-1 to enhance formalin-induced pain and edema. [0042] Compound 1 (0.3 to 3 mg/kg) was orally administered at a dose of 1 ml/100 g. Sixty minutes after oral administration, 0.7 % formalin-containing physiological saline containing ET-1 (10 pmol/paw) was subcutaneously injected in the right hind paws, to examine the effect of the Compound 1 on the ET-1-induced enhancements of formalin-induced pain and edema.

4. Statistic analysis

[0043] The results are shown in the form of mean \pm standard error. The significant difference between two groups was calculated the p-value by Students unpaired t-test. The significant difference between groups was analyzed by one-way analysis of variance, to calculate the p-values by the Dunnett's multiple range test. The p-value below 5 % was defined as statistically significant.

(Results)

1. ET-1-induced enhancement of formalin-induced pain and edema

[0044] 0.7 % formalin solution was subcutaneously injected in the mouse hind paws; then, bi-phase pain responses were observed. Transient pain response (licking and biting reactions; first phase) emerging within 5 minutes immediately after injection was observed, along with sustained pain response (second phase) with a peak around 20 minutes after injection of the formalin solution (Figs. 1A and 1B). Additionally, edema was induced on the hind legs through the injection of the 0.7 % formalin solution (Fig. 1C).

[0045] Simultaneous administration of ET-1 (3, 10 and 30 pmol/paw) together with the formalin solution significantly enhanced the first phase, second phase and edema in a dose-dependent manner (Figs. 1A, 1B and 1C).

2. The effects of test drug on the ET-1-induced enhancements of formalin-induced pain

[0046] Compound 1 (0.3, 1 and 3 mg/kg, p.o.) significantly suppressed the ET-1 (10 pmol/paw)-induced enhancements of formalin-induced pain (first phase, second phase) and edema (Figs. 2A, 2B and 2C).

Test Example 2

Test of inhibition of ET-1-induced cell growth of MC3T3-E1, osteoblast-like cells

(Method)

1. Cell used

[0047] MC3T3-E1, mouse osteoblast-like cells, was used in these experiments (Journal of Cell Biology, 96(1), 191-198, 1983).

2. Measurement of intracellular Ca^{2+} concentration

[0048] The cell was cultured in a cell disk (of a 13.5-mm diameter) until the cell reached confluency; thereafter, the cell was then cultured in the absence of serum, for about 12 hours or longer and used for this experiment. Fura 2-AM (4 μM) was added to the cell in the Hank's balanced salt solution (HBSS) (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM K_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM glucose and 20 mM Hepes, pH-7.4) and incubated at 37 °C for one hour. The cell disk was fixed in a quartz cell placing therein HBSS; the quartz cell was fixed in an intracellular Ca^{2+} assay unit (CAF-110). The experiment was started when the cell reached a constant state under agitation conditions with a stirrer at 37 °C. Intracellular Ca^{2+} concentration was estimated by measuring and detecting the ratio of fluorescence intensities at 500 nm with excitation wave lengths of 340/380 nm and calculating intracellular Ca^{2+} concentration using designated formula (J.Biol.Chem.,260,3440-3450,1985).

3. Measurement of DNA synthesis level

[0049] As DNA synthesis level, the incorporation of [^3H]-labeled thymidine was assayed. The cells were seeded at a density of 1.5×10^4 cells/well in a 96-well plate using 0.2 % FCS culture medium and cultured for 2 days. Subsequently, vehicle or ET-1 was added to the plate and cultured for 24 hours. Continuously, [^3H -methyl]-thymidine was added at 0.5 μCi /well to the culture and pulse-labeling performed for 6 hours. Continuously, SDS solution to a final concentration of 0.2% was added for solubilization of the cell, and after solubilization the radioactivity of [^3H -methyl]-thymidine used for DNA synthesis was counted with a liquid scintillation counter. As a control, the count of a culture to which the vehicle was added was defined 100 %, thus the percentage increase of DNA synthesis was calculated.

4. Cell number counting assay

[0050] Cell number was counted by using a reagent solution of a cell counting kit (DOJINDO). The cells were seeded at a density of 1.0×10^4 cells/well in a 24-well plate using 0.5% FCS culture medium and cultured for one day. Subsequently, vehicle or ET-1 was added to the plate and cultured for 72 hours. Continuously, a reagent solution was added at 100 μl /well to the culture and incubated at 37 °C for 3 hours. After this reaction, 200- μl portions were transferred from the individual wells of the 24-well plate to a 96-well plate, to measure the absorbance (at a wave length of 405 nm and a reference wave length of 650 nm) with a plate reader. As a control, the count of a culture to which the vehicle was added was defined 100 %, thus the percentage increase of cell number was calculated.

5. Test drugs

[0051] In each experiments, ET-1 and Compound 1 were within the concentration ranges of 10^{-13} to 10^{-6} M and 10^{-12} to 10^{-4} M, respectively, as the final concentrations thereof (all at 10-fold dilution series). Compound 1 was added about 2 minutes before the addition of ET-1 for the assay of intracellular Ca^{2+} concentration and about 2hr before the addition of ET-1 in other experiments.

6. Statistic analysis

[0052] The results are shown in the form of mean \pm standard error. The significant difference between groups was analyzed by one-way analysis of variance, to calculate the p-values by the Dunnett's multiple range test. The p-value below 5 % was defined as statistically significant. At each experiment, the EC_{50} value of ET-1 and the IC_{50} value of the Compound 1 were calculated by the Logistic regression analysis.

(Results)

[0053]

1. The inhibitory effect of Compound 1 on ET-1-induced increasing in intracellular Ca^{2+} concentration in MC3T3-E1/ET-1 (10^{-12} to 10^{-6} M) increased the intracellular Ca^{2+} concentration in the MC3T3-E1, mouse osteoblast-like cell in a concentration-dependent manner (Fig. 3A). The EC_{50} value of ET-1 was 7.39×10^{-9} M. Compound 1 (10^{-12} to 10^{-4} M) inhibited the ET-1 (10^{-8} M)-induced increasing in the intracellular Ca^{2+} concentration in a concentration-dependent manner (Fig. 3B). The IC_{50} value of Compound 1 was 1.02×10^{-8} M.
2. The inhibitory effect of Compound 1 on ET-1-induced increasing in cell growth of MC3T3-E1

[0054] ET-1 (10^{-13} to 10^{-6} M) significantly increased the incorporation of [^3H]-thymidine to increase DNA synthesis

in the MC3T3-E1, mouse osteoblast-like cells, in a concentration-dependent manner (Fig. 4A). The EC_{50} value of ET-1 was 9.84×10^{-12} M. Compound 1 (10^{-12} to 10^{-6} M) inhibited the ET-1 (10^{-10} M)-induced increasing in the incorporation of [3 H]-thymidine in a concentration-dependent manner (Fig. 4B). The IC_{50} value of Compound 1 was 1.15×10^{-8} M. [0055] Similarly, ET-1 (10^{-12} to 10^{-6} M) significantly increased the cell number of the MC3T3-E1 in a concentration-dependent manner at an experiment to assay cell number with WST-1 (Fig. 5A). The EC_{50} value of ET-1 was 2.20×10^{-11} M. Compound 1 (10^{-11} to 10^{-6} M) inhibited the ET-1 (10^{-9} M)-induced increasing in the cell number in a concentration-dependent manner (Fig. 5B). The IC_{50} value of Compound 1 was 9.54×10^{-9} M.

Test Example 3

Test of inhibition of ET-1-induced cell growth of hormone-refractory human prostate cancer cells (1)

(Method)

1. Cell used

[0056] PPC-1, hormone-refractory human prostate cancer cells, was used in these experiments (International Journal of Cancer, 44, 898-903, 1989).

2. Examination of the effect of ET-1 on the cell growth of PPC-1 and inhibitory effect of test drug thereon

[0057] DNA synthesis level was measured as the index of cell growth. As DNA synthesis level, the incorporation of [3 H]-labeled thymidine was assayed. The cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/well in a 96-well plate using no FCS-added culture medium and cultured for 5 days. Subsequently, vehicle or ET-1 was added to the plate and cultured for 24 hours. Continuously, [3 H-methyl]-thymidine was added at 0.5 μ Ci/well to the culture and pulse-labeling performed for 6 hours. Continuously, SDS solution to a final concentration of 0.2% was added for solubilization of the cell, and after solubilization the radioactivity of [3 H-methyl]-thymidine used for DNA synthesis was counted with a liquid scintillation counter. As a control, the count of a culture to which the vehicle was added was defined 100 %, thus the percentage increase of DNA synthesis was calculated.

3. Test drugs

[0058] In this experiment, ET-1 and Compound 1 were within the concentration ranges of 10^{-13} to 10^{-6} M (10-fold dilution series) and 10^{-10} to 3×10^{-6} M (3-fold dilution series), respectively. as the final concentrations thereof. Compound 1 was added about 2hr before the addition of ET-1.

4. Statistic analysis

[0059] The results are shown in the form of mean \pm standard error. The significant difference between groups was analyzed by one-way analysis of variance, and calculated the p-values by the Dunnett's multiple range test. The p-value below 5 % was defined as statistically significant. The IC_{50} value of the Compound 1 were calculated by the Logistic regression analysis.

(Results)

[0060] As shown in Fig. 6A, ET-1 (10^{-13} to 10^{-6} M) increased the incorporation of [3 H]-thymidine in the PPC-1, hormone-refractory human prostate cancer cells, in a concentration-dependent manner, suggesting the exertion of the action to promote cell growth. The effect of ET-1 above 10^{-8} M was statistically significant.

[0061] The compound 1 (10^{-10} to 3×10^{-6} M) inhibited the ET-1 (10^{-8} M)-induced promotion of PPC-1 cell growth in a concentration-dependent manner, and the IC_{50} value was 28 ± 9.8 nM (Fig. 6B). The inhibitory effect of the Compound 1 above 3×10^{-7} M was statistically significant.

Test Example 4

Test of inhibition of ET-1-induced cell growth of hormone-refractory human prostate cancer cells (2)

(Method)

1. Cell used

[0062] PPC-1, hormone-refractory human prostate cancer cells, was used in these experiments (International Journal of Cancer, 44, 898-903, 1989).

2. Examination of the effect of ET-1 on the cell growth and inhibitory effect of test drug thereon

[0063] Cell number was counted by using a reagent solution of a alamar blue. The cells were seeded at 2×10^4 cells/well in a 24-well plate, after adhesion, the culture media were exchanged to culture media with no FCS-added, and further cultured for another 24 hours. Thereafter, vehicle or ET-1 (10^{-11} to 10^{-6} M) was added, and cultured for 96 hours. The final volume of the culture medium was 500 μ l. Alamar blue of 50 μ l was added to the culture, and incubated for 4 hours. After reaction; 100 μ l portions collected from the individual wells of the 24-well plate were then transferred to a 96-well plate, and measured the absorbance (at a wave length of 405 nm and a reference wave length of 650 nm) with a plate reader. As a control, the count of a culture to which the vehicle was added was defined 100%, thus the percentage increase of cell number was calculated. The inhibitory effect of the compound was examined by adding the Compound 1 to a final concentration of 10^{-9} to 10^{-5} M, 30 minutes prior to the addition of ET-1 at 10^{-7} M.

[0064] At the experiment, the culture medium was exchanged to a culture medium to which ET-1 was contained, 48 hours after stimulation, because the degradation of ET-1 was possible.

(Results)

[0065] As shown in Table 2, the cell growth induced by ET-1 was observed in PPC-1, starting from 10^{-11} M.

Table 2

ET-1 (M)	Cell growth (%)
0 (control)	100.0
10^{-11}	119.6
10^{-10}	122.3
10^{-9}	124.0
10^{-8}	115.3
10^{-7}	119.3
(n=7)	

[0066] Additionally, as shown in Table 3, the Compound 1 inhibited the cell growth induced by 10^{-7} M ET-1 in PPC-1, starting from 10^{-6} M.

Table 3

ET-1	Compound 1	Cell growth (%)
-	-	100.0
10^{-7} M	0	110.5
	10^{-6} M	99.2
	10^{-5} M	98.1
(n = 7)		

Test Example 5

Clinical study in prostate cancer patients

(Method)

[0067] A clinical study was carried out under the following conditions using the patients suffering from prostate cancer.

[0068] Subjects: eighteen patients of at least 45 years of age with prostate cancer(stage D2) who are hormone-refractory or have relapsed after anti-androgen therapy.

Test drug: Compound 1

Strength: 2, 10 and 40 mg tablets

Dosage: 2, 4, 10, 20, 60, 120 and 240 mg/day - dose frequency was once daily or twice daily

Duration of treatment: four weeks (28 days)

Parameters for evaluation: Evaluations and measurements were made for the following items before and after the administration.

(1) Prostate specific antigen (PSA)

(2) Bone metabolism markers (bone alkaline phosphatase or ratio of deoxypyridinoline/creatinine)

(3) Bone pain (change of visual analogue scale(VAS)/use of analgesics)

(Results)

[0069] The Compound 1 is effective in improving each observed items, starting at a dose of 2 mg/day. The Compound 1 improved pain score VAS in nine (out of eighteen) patients. The Compound 1 reduced analgesics in four (out of eighteen) patients. The Compound 1 improved prostate cancer marker PSA in ten patients and stabilized in two other patients. The Compound 1 decreased bone specific alkaline phosphatase in eleven (out of eighteen) patients and improved the ratio of deoxypyridinoline/creatinine in fourteen (out of eighteen) patients.

Test Example 6

Plasma concentration when orally administered to humans

(Method)

[0070] For the purpose of the assessment of the pharmacokinetics, tolerance and safety of Compound 1 when orally administered, the Compound 1 was administered at a single dose of 10 mg to 3 subjects of progressive prostate cancer patients after prostatectomy. So as to assay the plasma concentration of intact Compound 1, blood of 6 ml was collected in a lithium heparin-containing polyethylene tube, prior to administration and at individual times of 30 minutes, one hour, 1.5 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 36 hours and 48 hours after administration, followed by immediate centrifugation (4 °C, 10 minutes, 3500 rpm), to recover the plasma. The plasma samples were stored under freezing at -70 °C until the concentration was assayed. The plasma concentration was assayed by the LC-MS/MS method.

(Results)

[0071] As shown in Table 4, the C_{max} and AUC of the Compound 1 when orally administered at a single dose of 10 mg were at higher values about 11-fold and about 18-fold, respectively, those of ABT-627 administered at 20 mg.

Table 4

	AUC (ng·h/ml)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)
Compound 1 10 mg	14700	1000	2	13
ABT-627 20 mg *	802	93.5	0.6	28.4
Compound 1 (10mg) / ABT-627 (20 mg)	18	11		

*) 6th International Conference on Endothelin, Oct. 10-13, 1999, Abstract No. 219.

[0072] The results of the Test Example 1 verify that the Compound 1 is useful as a pain reduction agent for endothelin-induced diseases.

[0073] The results of the Test Example 2 verify that the Compound 1 ameliorates osteogenic bone disorders and is useful as an agent to reduce pain involved in osteogenesis.

5 [0074] Additionally in the Test Example 2, it is indicated that ET-1 induces osteoblast-like cell response, starting from a very low concentration of about 1×10^{-11} M. In a report concerning the ET-1 generation potencies of human prostate cancer cell lines, ET-1 generation of about several tens pg/ml 10^6 cells/24 hr is reported (Nat. Med., 1(9), 944-949, 1995). The concentration corresponds to about 1×10^{-11} M. The results of the Test Example 2 indicate evidences strongly suggesting the possibility of ET-1 generated in the prostate cancer cells to form an osteogenic bone disorder.

10 In the Test Example 2, it is shown that the Compound 1 at a low concentration around 10 nM suppresses the osteoblast-like cell response due to ET-1. Therefore, it is strongly suggested that the Compound 1 exerts an amelioration effect of osteogenic bone disorders in prostate cancer patients, for which ET-1 is suggested to be responsible. Taking account of the results of the Test Example 1 together, it is strongly suggested that the Compound 1 is useful as an agent for reducing pain involved in the bone metastasis of prostate cancer.

15 [0075] Additionally, the results of the Test Example 5 support that the Compound 1 is useful as an agent for reducing pain involved in the bone metastasis of prostate cancer.

[0076] The results of the Test Examples 3 and 4 verify that the Compound 1 is useful as a suppressive agent of the growth of the hormone-resistant cancer cell of prostate cancer. Additionally, it is strongly suggested that the Compound 1 exerts an effect on the suppression of the progress of prostate cancer.

20 [0077] Additionally, the results of the Test Example 5 also support that the Compound 1 is effective as a suppressive agent of the progress of prostate cancer.

[0078] Furthermore, it is indicated in the test Example 6 that the AUC of the Compound 1 at a half dose of ABT-627 is as high as about 18-fold that of ABT-627 approved as a known ET_A receptor antagonist, suggesting that the oral absorptivity and pharmacokinetics of the Compound 1 when orally administered are great. Though, the affinity of the

25 Compound 1 to human ET_A receptor is 0.697 nM(WO97/22595) and similarly that of ABT-627 is 0.48 nM(J.Pharmacol. Exp.Ther.,276,473-481,1996), the Compound 1 is promising as a greater oral therapeutic agent than ABT-627.

[0079] Additionally in the Test Example 5, the Compound 1 is effective, starting at a dose of 2 mg, which verifies that the Compound 1 is a great oral therapeutic agent of prostate cancer, because the dose corresponds to 1/5-fold the minimum effective dose of ABT-627, which is reported to be 10 mg(Proceeding of ASCO,19,1314,2000). Thus, it is

30 confirmed that the Compound 1 is a great oral therapeutic agent of prostate cancer.

Industrial Applicability

[0080] According to the invention, a great oral therapeutic agent of prostate cancer can be provided, which is effective

35 in clinical practice. In other words, a therapeutic agent for reducing pain in an endothelin-induced disease, such as such as cancer (particularly, prostate cancer, breast cancer), arthritis, prostatitis, glioma, peripheral artery occlusion, dysmenorrhea, migraine headache, angina, acute cardiac infarction, cerebral infarction, subarachnoid hemorrhage, diabetic nervous disorders, rheumatoid arthritis, glaucoma, gastric ulcer and labor during delivery can be provided.

40 Additionally, a therapeutic agent for ameliorating osteogenic disorders and/or a therapeutic agent for reducing pain involved in osteogenesis, particularly a therapeutic agent for reducing pain involved in the bone metastasis of prostate cancer and/or a therapeutic agent for ameliorating osteogenic disorders due to the bone metastasis of prostate cancer can be provided. Further, a therapeutic agent for suppressing the growth of the cancer cell of prostate cancer and/or a therapeutic agent for suppressing the progress of prostate cancer can be provided.

Claims

1. A pharmaceutical composition for reducing pain in an endothelin-induced disease, the pharmaceutical composition containing N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or
- 50 a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective component.
2. A pharmaceutical composition according to claim 1, wherein the endothelin-induced disease is prostate cancer.
3. A pharmaceutical composition for ameliorating osteogenic disorders, the pharmaceutical composition containing
- 55 N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective component.
4. A pharmaceutical composition for reducing pain involved in osteogenesis, the pharmaceutical composition con-

EP 1 256 344 A1

aining N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective component.

- 5 5. A pharmaceutical composition for reducing pain involved in the bone metastasis of prostate cancer, the pharmaceutical composition containing N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective component.
- 10 6. A pharmaceutical composition for ameliorating osteogenic disorders due to the bone metastasis of prostate cancer, the pharmaceutical composition containing N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective component.
- 15 7. A pharmaceutical composition for suppressing the growth of the cancer cell of prostate cancer, the pharmaceutical composition containing N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective component.
- 20 8. A pharmaceutical composition for suppressing the growth of the cancer cell according to claim 7, wherein the prostate cancer is a hormone-non-dependent prostate cancer.
- 25 9. A pharmaceutical composition for suppressing the progress of prostate cancer, the pharmaceutical composition containing N-[6-methoxy-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(2-pyrimidinyl)-4-pyrimidinyl]-2-phenylethanesulfonamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the effective component.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

Fig. 1

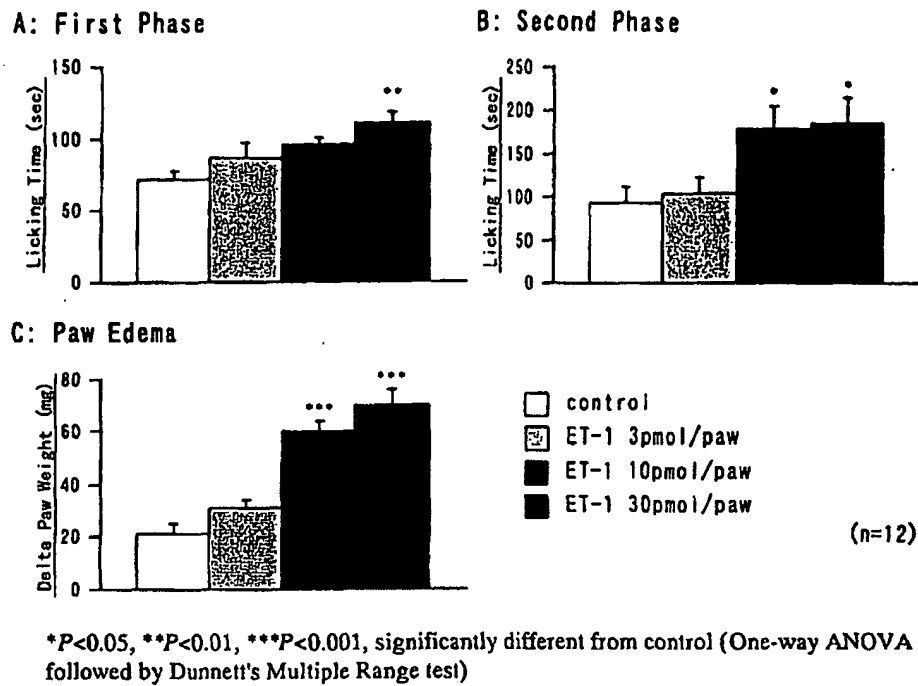


Fig. 2

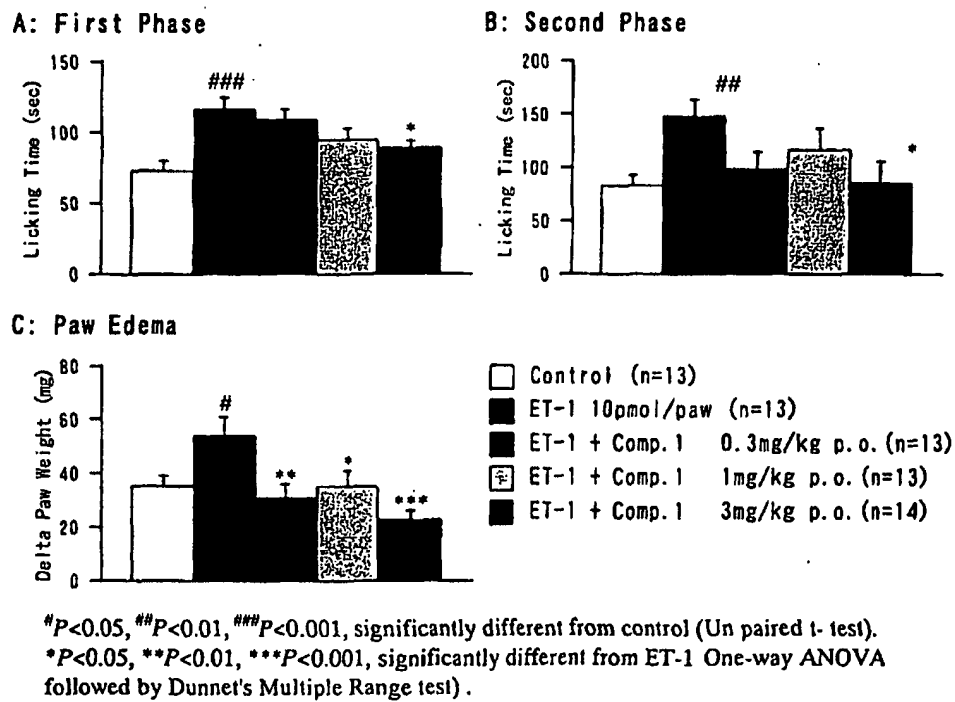


Fig. 3

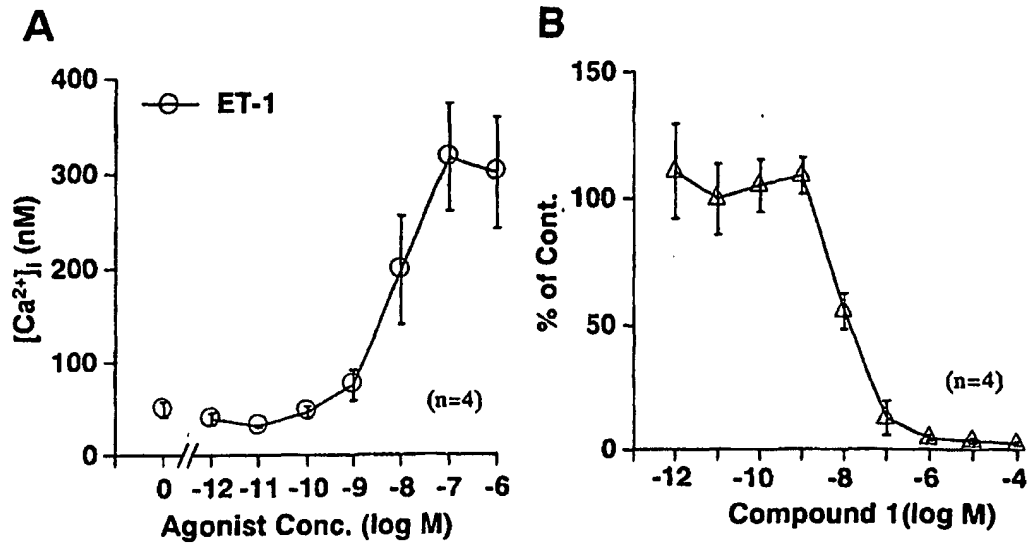


Fig. 4

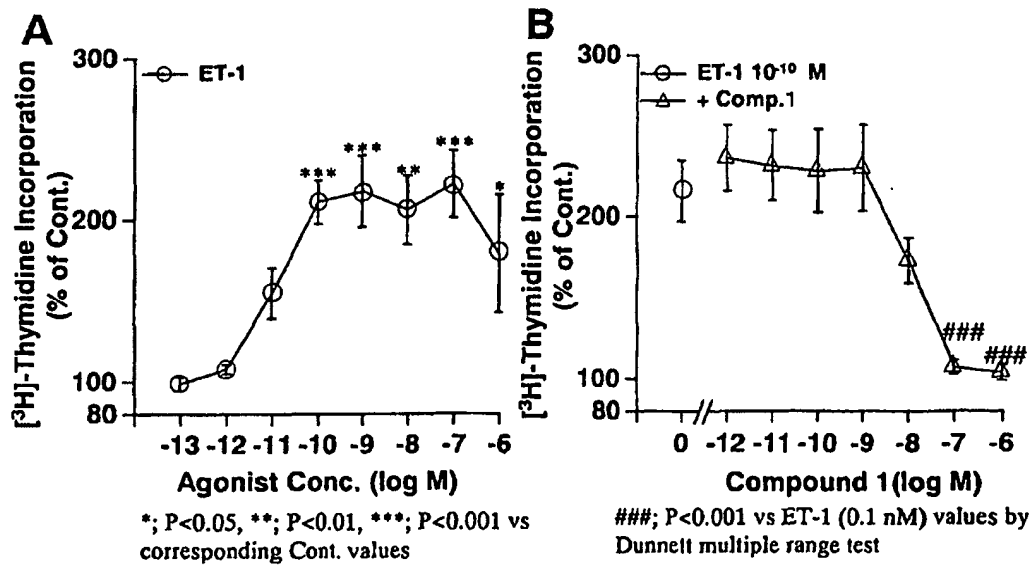


Fig. 5

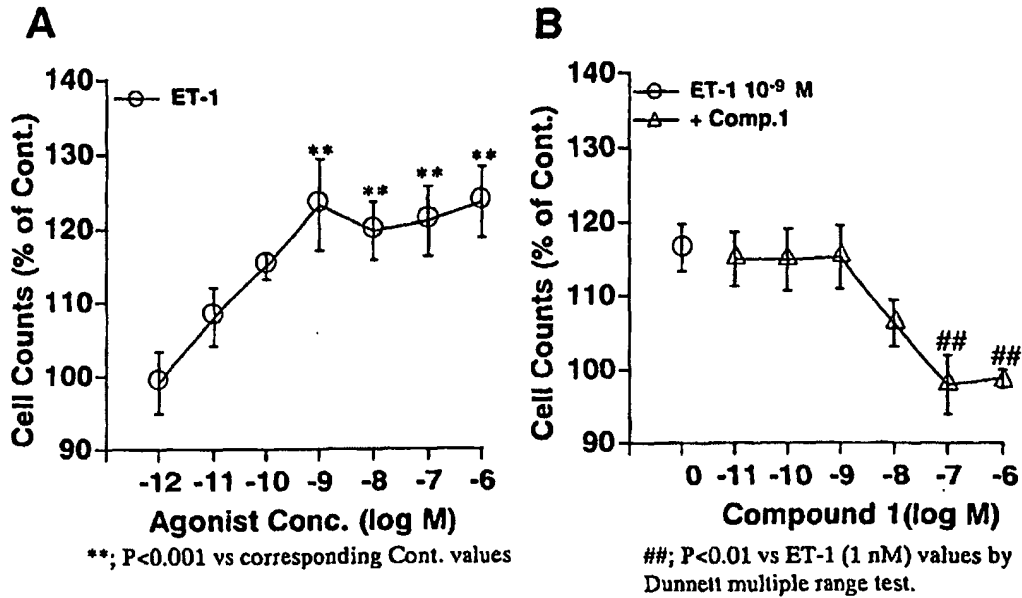
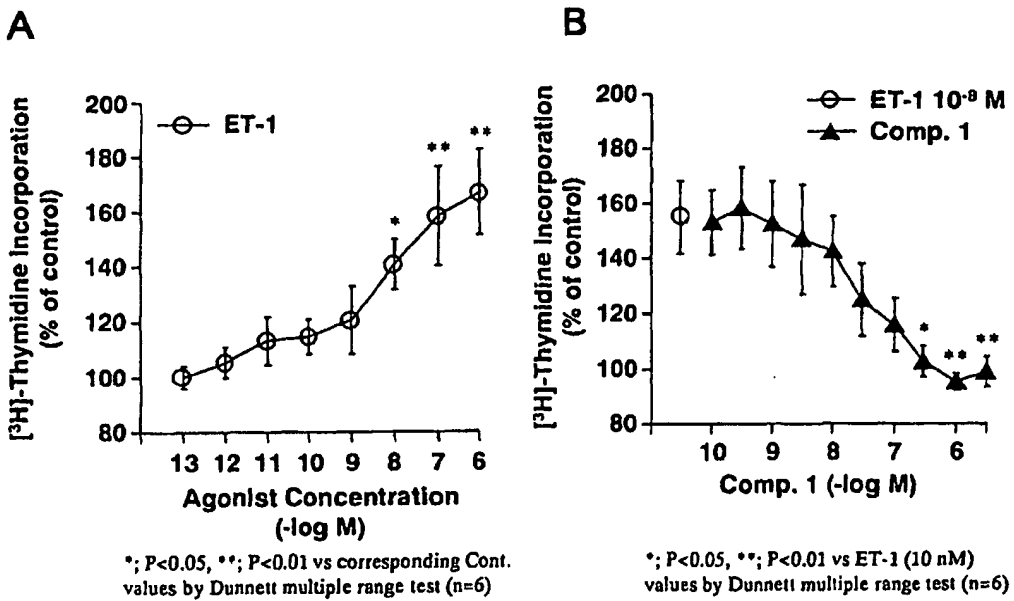


Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ A61K31/505, A61P35/00// C07D239/46		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ A61K31/505, C07D239/46, A61P35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, REGISTRY, MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/22595, A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 26 June, 1997 (26.06.97), page 49, Table 7, Ex.2, compound; Claims 9,10 & EP, 882719, A1 & CN, 1204326, A & BR, 9612061 & JP, 3087968, B2 & US 6083955, A	1-9
Y	WO, 99/56761, A1 (DAVAR, Gudarz), 11 November, 1999 (11.11.99), Full text (Family: none)	1-9
Y	WO, 98/41206, A1 (BASF AKTIENGESSELLSCHAFT), 24 September, 1998 (24.09.98), page 34, last line to page 40, line 20; Claims 1-12 & US, 6030975, A & AU, 9866946, A1 & EP, 969841, A1 & BR, 9808263, A & NO, 9904426, A	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 January, 2001 (23.01.01)		Date of mailing of the international search report 06 February, 2001 (06.02.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.